

Maiju Selin

DNA-oligonukleotidituotannon MALDI-TOF-laadunvalvonnan automatisointi

Metropolia Ammattikorkeakoulu
Laboratorioanalyttikko (AMK)
Laboratorioalan koulutusohjelma
Opinnäytetyö
8.10.2014

Tekijä Otsikko Sivumäärä Aika	Maiju Selin DNA-oligonukleotidituotannon MALDI-TOF-laadunvalvonnan automatisointi 35 sivua 8.10.2014
Tutkinto	Laboratorioanalyttikko (AMK)
Koulutusohjelma	Laboratorioala
Ohjaajat	Oligomer Oy, tuotantopäällikkö Matti Laakso Metropolia AMK, lehtori Kari Raatikainen
<p>Tämä opinnäytetyö tehtiin yhteistyössä DNA-oligonukleotideja valmistavan Oligomer Oy:n kanssa. Yrityksen valmistamat DNA-oligonukleotidit ovat lyhyitä, yleisimmin luonnollisista emäksistä muodostuvia, synteettisiä DNA-molekyylejä. Opinnäytetyön tarkoituksena oli automatisoida DNA-oligonukleotidituotannon MALDI-TOF-massa-analyysiin perustuva laadunvalvonta. Ensimmäisenä tavoitteena oli luoda pipetointirobottia ohjaava metodi, jonka avulla matriisi ja laadunvalvontanäytteet saataisiin pipetoitua automatisoidusti näytelevylle. Toisena tavoitteena oli tutkia, pystyykö MALDI-TOF-laitteen ohjelmistoversiolla luomaan metodia, jonka avulla laadunvalvontanäytteet voitaisiin analysoida automaattisesti.</p> <p>Pipetointirobotin ohjelmointi matriisin ja laadunvalvontanäytteiden pipetoinnille näytelevylle onnistui hyvin. Lisäksi MALDI-TOF-laitteelle saatiin luotua metodi, jonka avulla laadunvalvontanäytteet voitiin mitata ohjelmoidusti ja saatu mittaustiedosto tallennettua tiedostoon.</p> <p>Massa-analyysin optimaalisen automatisoinnin esteeksi muodostui kuitenkin näytepisaran epätasainen kuivumismuoto, jonka takia lasersäteen osuminen pisaran näytealueelle oli sattumanvaraista ja automaattinen analyysi antoi hylättyjä taustaspektrejä. Luotua metodia voitiin kuitenkin hyödyntää esimerkiksi suurien laadunvalvontanäytemäärien massa-analyyseissa.</p>	
Avainsanat	MALDI-TOF, oligo, laadunvalvonta

Author Title	Maiju Selin Automatizing the MALDI-TOF quality control of DNA oligonucleotide production
Number of Pages Date	35 pages 8 October 2014
Degree	Bachelor of Laboratory Sciences
Degree Programme	Laboratory Sciences
Instructors	Matti Laakso, Production Manager, Oligomer Oy Kari Raatikainen, Lecturer, Metropolia UAS
<p>This bachelor's thesis was conducted in cooperation with Oligomer Oy, which produces short synthetic DNA oligonucleotides. The main focus of this thesis was to automatize the MALDI-TOF quality control of DNA oligonucleotides. The first goal was to create a pipetting method for the liquid-handling robot and use it for pipetting the matrix and quality control samples automatically to the MALDI-TOF's sample plate. The second goal was to investigate whether an automatic run sequence which would measure the quality control samples automatically could be created with current software version of MALDI-TOF-device.</p> <p>Both goals were achieved. As a result of the new method, the liquid-handling robot pipetted both matrix and quality control samples successfully to the sample plate, and the MALDI-TOF's automatic run sequence could be used for measuring the samples automatically.</p> <p>The biggest obstacle for the use of MALDI-TOF run sequence was that the matrix and the samples did not dry homogeneously on the sample plate. The empty area on the center of the matrix-sample-drop caused some unwanted background spectra; therefore, in some cases, the samples were not measured properly. Otherwise, the method worked well and can be used in the quality control of DNA oligonucleotides.</p>	
Keywords	MALDI-TOF, oligo, quality control

Sisällys

1	Johdanto	1
2	DNA-oligonukleotidien käyttö	3
3	DNA-oligonukleotidien synteesi fosforamidiitti-kemialla	8
4	DNA-oligonukleotidien puhdistus	14
4.1	Puhdistusmenetelmien kuvaus	15
4.2	HPLC:n hyödyntäminen laadunvalvonnassa	17
5	DNA-oligonukleotidituotannon laadunvalvonta MALDI-TOF-menetelmällä	19
5.1	Yleistä tietoa massaspektrometriasta	19
5.2	MALDI-TOF-menetelmä	21
5.3	DNA-oligonukleotidien MALDI-TOF-massa-analysointi (vain työn tilaajan käyttöön)	25
6	Työn toteutus, tulokset ja niiden tarkastelu	26
6.1	Lähtötilanteen kuvaus ja opinnäytetyön tavoitteet	26
6.2	Pipetointirobotin ohjelmointi	27
6.3	MALDI-TOF-analyysin automatisointi	29
6.3.1	Eri näytelevyjen ja näytekonsentraation testaus	29
6.3.2	Ajometodin luominen ja näytetietojen siirto ohjelmaan	32
7	Pohdinta	33
	Lähteet	34
	Liitteet (vain työn tilaajan käyttöön)	

1 Johdanto

Tämä opinnäytetyö tehtiin yhteistyössä Oligomer Oy:n kanssa. Oligomer Oy on Helsingissä Viikin kampusalueella sijaitseva vuonna 2003 perustettu DNA-oligonukleotideja valmistava yritys, joka palvelee toiminnallaan yliopistoja, tutkimuslaitoksia ja teollisuutta niin Suomessa kuin ulkomailla. Yrityksen valmistamat DNA-oligonukleotidit ovat lyhyitä, synteettisiä DNA-molekyylejä, jotka koostuvat enimmillään noin 150 nukleotidista. Yleisimmin käytetyt nukleotidit ovat neljä luonnollista emästä eli adeniini, tymiini, guaniini ja sytosiini. Näiden lisäksi synteettisen DNA-molekyylin sekvenssissä voi olla myös inosiinia ja urasiilia tai tarpeen mukaan esimerkiksi fluoresoivaa merkkiainetta. DNA-oligonukleotidit, joista tässä työssä käytetään myös niiden yleistä nimitystä oligo, syntetisoidaan automatisoidussa nukleinihapposyntetisaattorissa. Näin valmistettuja oligoja käytetään pääasiassa geneettisen DNA-materiaalin tutkimiseen geenitekniikan ja molekyylibiologian tutkimusmenetelmissä. [1; 2; 3.]

Oligomer Oy:llä DNA-oligonukleotidituotannon laadunvalvonta kattaa koko synteesi-prosessin. Synteessin monitoroinnin lisäksi tuotannon aikana seurataan sekä laitteiden että liuosten toimintaa. Mikäli laitteiden tai liuosten toiminnassa havaitaan prosessin aikana puutteita, esimerkiksi muutoksia virtausnopeudessa tai liuosten laadussa, keskeytetään meneillään ollut vaihe ja puute korjataan. [4.]

Itse synteesiä monitoroidaan spektrofotometristen mittausten avulla. Käytettyjen nukleotidien suojausryhmät muodostavat värillisen reaktiotuotteen irrotessaan oligosta, ja tämän värireaktion voimakkuuden perusteella voidaan seurata synteessin etenemistä. Myös HPLC (high performance liquid chromatography, korkean erotuskyvyn nestekromatografia) -puhdistus toimii tuotteen puhdistuksen lisäksi yhtenä laadunvalvonnan välineenä. Kromatogrammien perusteella voidaan tehdä alustavia päätelmiä saannosta sekä tarpeesta tarkempaan laatuanalyysiin, sillä kromatogrammeissa näkyvät hyvin dimeerit, vajaamittaiset oligot sekä leimauksen onnistuminen. Puhdistuksen jälkeen saantomittaus näyttää synteessin määrällisen onnistumisen. [4.]

Oligoiden massa-analyysi tehdään MALDI-TOF-analyysillä (matrix assisted laser desorption/ionisation - time of flight, matriisiavusteinen laserdesorptioionisaatio - lentoaika-massa-analysaattori). Analyysin avulla saadaan tarkka tieto analysoidun tuotteen oligoiden molekyylipainoista sekä tuotteen seassa olevista mahdollisista vajaamittaisista

tai virheellisistä oligoista. Lähtötilanteen mukaan MALDI-matriisi ja laadunvalvontanäytteet pipetoitiin käsin näytelevylle ja analysoitiin yksitellen MALDI-TOF-laitteella. Tämä tapa oli kuitenkin työläs, mikäli analysoitavia näytteitä oli paljon. Myös pipetointivirheen riski oli olemassa. [4.]

Tämän opinnäytetyön tarkoituksena oli automatisoida DNA-oligonukleotidituotannon MALDI-TOF-massa-analyysiin perustuva laadunvalvonta. Tavoitteena oli luoda pipetointirobottia ohjaava metodi, jonka avulla matriisi ja laadunvalvontanäytteet saataisiin pipetoitua automatisoidusti näytelevylle. Lisäksi tavoitteena oli tutkia, pystyikö nykyisellä MALDI-TOF-laitteen ohjelmistoversiolla luomaan metodin, jonka avulla laadunvalvontanäytteet voitaisiin analysoida automaattisesti.

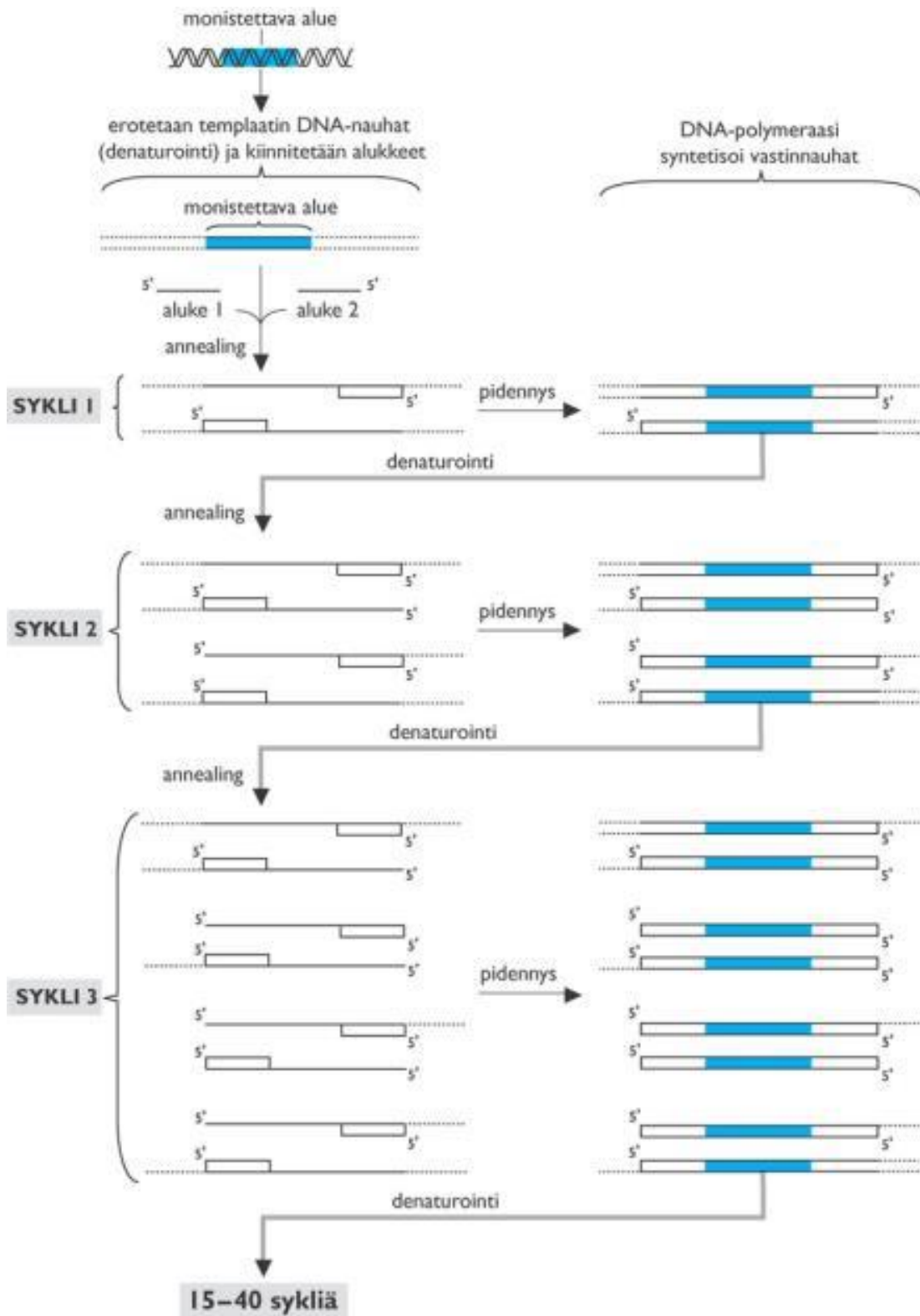
Tässä opinnäytetyössä kuvatut synteesi-, puhdistus- ja laadunvalvontamenetelmät on kuvattu Oligomer Oy:llä käytössä olevien toimintatapojen ja kirjallisuuslähteiden perusteella, joten ne voivat poiketa muiden tuotevalmistajien tavoista. Osa opinnäytetyön materiaalista on tietosuojaan alaista, joten lisätietoja voi tarvittaessa tiedustella suoraan Oligomer Oy:ltä.

2 DNA-oligonukleotidien käyttö

DNA-oligonukleotideja hyödynnetään geneettisen DNA-materiaalin tutkimisessa monissa geenitekniikan ja molekyylibiologian tutkimusmenetelmissä. Tässä luvussa on kuvattu kaksi yleisintä menetelmää eli polymeerasiketjureaktio (PCR, polymerase chain reaction) ja sen sovellus reaaliaikainen PCR. Lisäksi on havainnollistettu muutamia oligoiden suunnittelun ja toiminnan kannalta tärkeitä seikkoja. PCR-menetelmien yhteydessä oligoista käytetään yleisesti nimityksiä aluke ja koetin tai englanninkielisiä vastineita primer ja probe.

Polymeerasiketjureaktiolla monistetaan DNA-jaksoja, jotka sijaitsevat kahden nukleotidijärjestykseltään tunnetun DNA-jakson välissä. PCR:n perusajatuksena on rajata monistettava DNA-alue kahden alukkeen avulla siten, että alukkeet kiinnittyvät kaksijuosteisen kohde-DNA:n eli templaatin eri juosteisiin monistettavan alueen vastakkaisiin päihin. PCR-reaktion periaate on esitetty kuviossa 1. [5, s. 107; 6, s. 153.]

PCR-reaktion denaturaatio-vaiheessa kaksijuosteisesta templaatista muodostetaan yksijuosteista korkean lämpötilan avulla. Seuraavassa annealing-vaiheessa lämpötilaa lasketaan hieman, jolloin alukkeet kiinnittyvät komplementaarisesti yksijuosteiseen templaattiin. Ekstensio- eli pidennysvaiheessa DNA-polymeerasientsyymit kiinnittyvät alukekohtiin ja liittävät reaktioseoksessa olevia nukleotideja alukkeen 3'-päästä lähtien templaatin mallin mukaan. Kopioitumisen valmistuttua sykli aloitetaan alusta. Lämpösykliä ja DNA-polymeerasientsyymien avulla templaatista voidaan monistaa jopa miljoonia kopioita. [5, 107 - 111; 6, s. 153 - 158.]



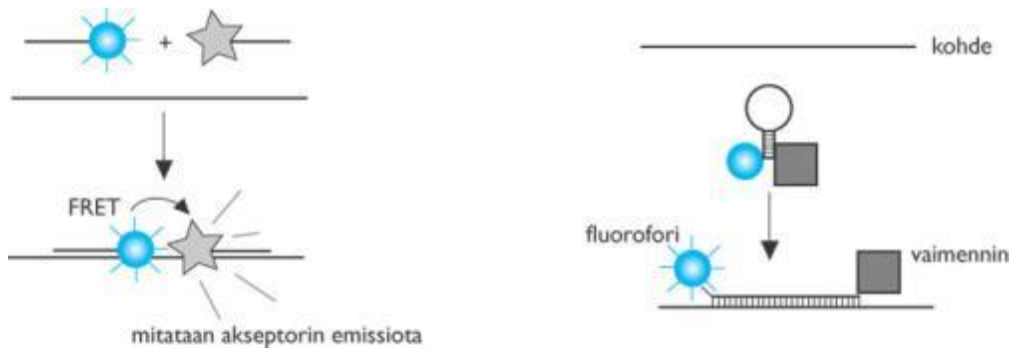
Kuvio 1. PCR-reaktion periaate. Lämpötilasykliä avulla kohde-DNA:sta saadaan monistettua useita kopioita [6, s. 157].

Reaaliaikainen PCR on yksi tavallisen PCR:n sovellutuksista. Tässä PCR-menetelmässä hyödynnetään fluoresoivia merkkiaineita, jotka sitoutuvat reaktioiden aikana kaksijuosteiseen monistettuun DNA-ketjuun. Reaktioiden ja monistumisen etenemistä voidaan seurata mittaamalla fluoresenssisignaalin voimakkuutta. Reaaliaikaisessa PCR:ssä käytetään tavallisten alukkeiden lisäksi usein myös fluoresoivalla merkkiaineella modifioituja koettimia, jolloin reaktioiden etenemistä seurataan koettimien fluoroforien signaalin perusteella. [6, s. 166 - 167.]

Koettimien toiminta perustuu yleensä energiansiirtotekniikkaan tai fluoresoinnin sammutukseen. Energiansiirtotekniikassa on käytössä kaksi fluoroforia, jotka sijaitsevat yleensä eri koettimissa. Tässä menetelmässä viritetään ensin toinen fluoroforeista sille ominaisella aallonpituudella, minkä jälkeen sen lähettämä energia siirtyy toisen koettimen fluoroforille. Toisen koettimen spesifinen signaali mitataan. Signaali syntyy vain, jos molemmat koettimet sitoutuvat oikeille alueille kohde-DNA:ssa. [6, s. 168.]

Sammutustekniikassa koettimen 5'-päässä on fluoresoiva leima ja 3'-päässä leiman sammuttaja (quencher). Koettimen ollessa irrallaan reaktioseoksessa, sen fluoresointi on heikkoa, sillä fluoroforin eksitaatioenergia siirtyy sammuttajalle. Kun koetin on kiinnittynyt templaattiin, DNA-polymeraasientsyymi hajottaa sen kopioidessaan juostetta. Tällöin fluorofori ja sammuttaja joutuvat erilleen toisistaan ja fluoroforin signaali voimistuu. Molemmissa tekniikoissa fluoroforien signaalit voimistuvat monistumisen edetessä. [6, s. 168.]

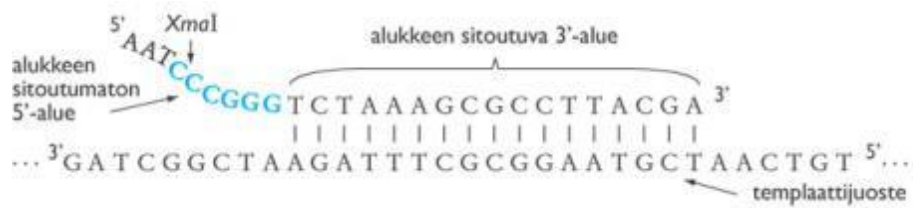
Kuviossa 2 on kuvattu FRET (fluorescence resonance energy transfer)-menetelmän ja hairpin-koettimen toiminta. FRET-menetelmä perustuu energiansiirtotekniikkaan, kun taas Hairpin-koetin on yhdenlainen sovellus fluoresoinnin sammutustekniikasta. Hairpin-koettimessa fluoresointi voimistuu koettimen kiinnittyessä templaattiin, jolloin fluorofori ja sammuttaja joutuvat riittävän erilleen toisistaan. [6, s. 168.]



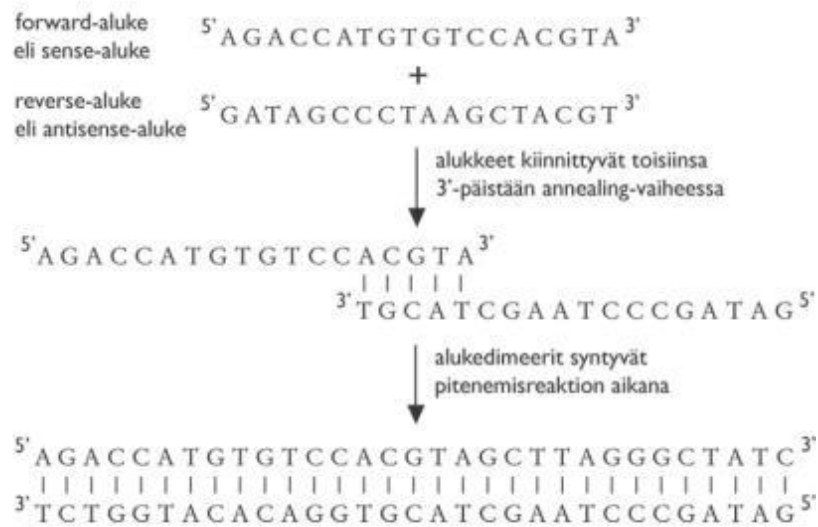
Kuvio 2. Fluoroforien toimintaperiaate. FRET-tekniikassa koettimien fluoresointi voimistuu vasta, kun fluoroforit ovat riittävän lähellä toisiaan. Hairpin-tekniikassa taas fluoroforien on oltava erillään toisistaan, jotta vaimenninleima ei estä toisen fluoresointia. [6, s. 168.]

Yksi tärkeimmistä PCR-menetelmien työvaiheista on alukkeiden suunnittelu. Sen lisäksi, että alukkeiden on kiinnityttävä komplementaarisesti ja spesifisesti oikeaan kohtaan kohde-DNA:ssa, on myös PCR-reaktioiden annealing-vaiheen lämpötila riippuvainen alukkeiden pituudesta, nukleotidikoostumuksesta ja -pitoisuudesta. Alukkeiden avulla on myös mahdollista muokata monistuvien juosteiden emäskoostumusta. Tarvittaessa alukkeet voidaan suunnitella siten, että ne lisäävät esimerkiksi restriktioentsyymien tunnistuskohdan juosteiden päihin. Esimerkki tällaisesta muokkauksesta on kuviossa 3. [5, s. 110 - 111; 6, s. 160 - 161, 172.]

Alukkeiden suunnitteluohjelmat antavat usein myös arvioin siitä, onko alukeparilla taipumusta sitoutua toisiinsa ja muodostaa alukedimeerejä (primer dimer) (ks. kuvio 4) tai self-dimeerejä, joilloin aluke voi sitoutua kaksijuosteiseksi itsensä kanssa. Aluke- ja self-dimeerit vähentävät vapaana olevien alukkeiden määrää reaktioseoksessa ja siten pienentävät PCR-reaktion saantoa. Kaikissa tapauksissa dimeerien muodostuminen ei kuitenkaan ole haitallinen asia, sillä esimerkiksi hairpin-tekniikassa self-dimeerien muodostuminen on oleellinen osa koettimien toimintaa. [5, s. 110 - 111; 6, s. 160 - 161, 172.]



Kuvio 3. Alukkeen 5'-päähän on lisätty restriktioentsyymin tunnistuskohda [6, s. 172].

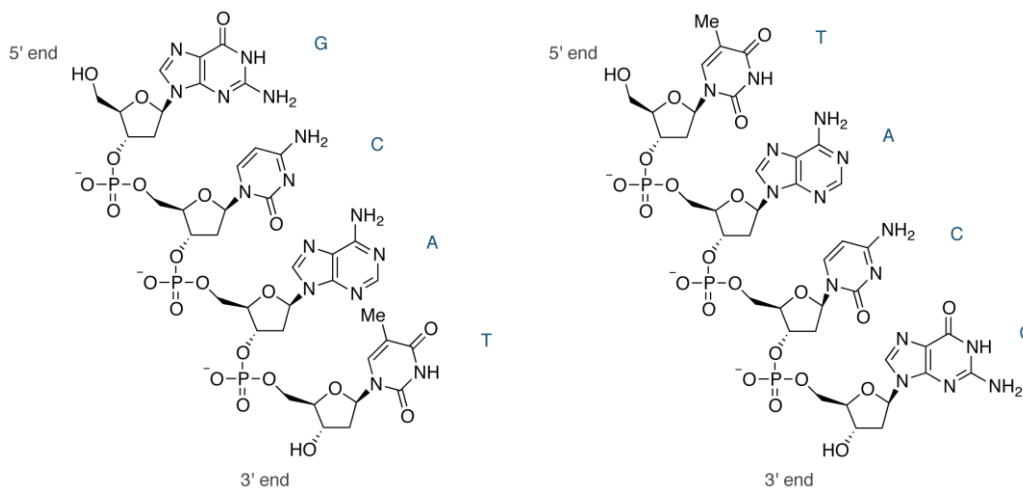


Kuvio 4. Alukedimeerien muodostuminen monistumisen aikana [6, s. 161].

3 DNA-oligonukleotidien synteesi fosforamidiitti-kemialla

DNA-oligonukleotidit ovat lyhyitä, synteettisesti valmistettuja yksijuosteisia DNA-molekyyliä, jotka koostuvat yleensä neljästä luonnollisesta emäksestä eli adeniinista (A), tymiinistä (T), guaniinista (G) ja sytosiinista (C). Näiden lisäksi oligon sekvenssi, eli koostumus, voi sisältää erilaisia modifikaatioita, kuten leimoja tai fluoroforeja. Oligon nukleosidit (emäs ja sokeriosa), on sidottu toisiinsa fosfaattidiesterisidoksin (ks. kuvio 5). Nukleotidien (emäs, sokeriosa ja fosfaattisidos) määrä vaihtelee käyttötarkoituksen mukaan noin 6 noin 150 nukleotidiin. Yleisin oligoiden pituus on kuitenkin noin 20 - 70 nukleotidia. [3; 4.]

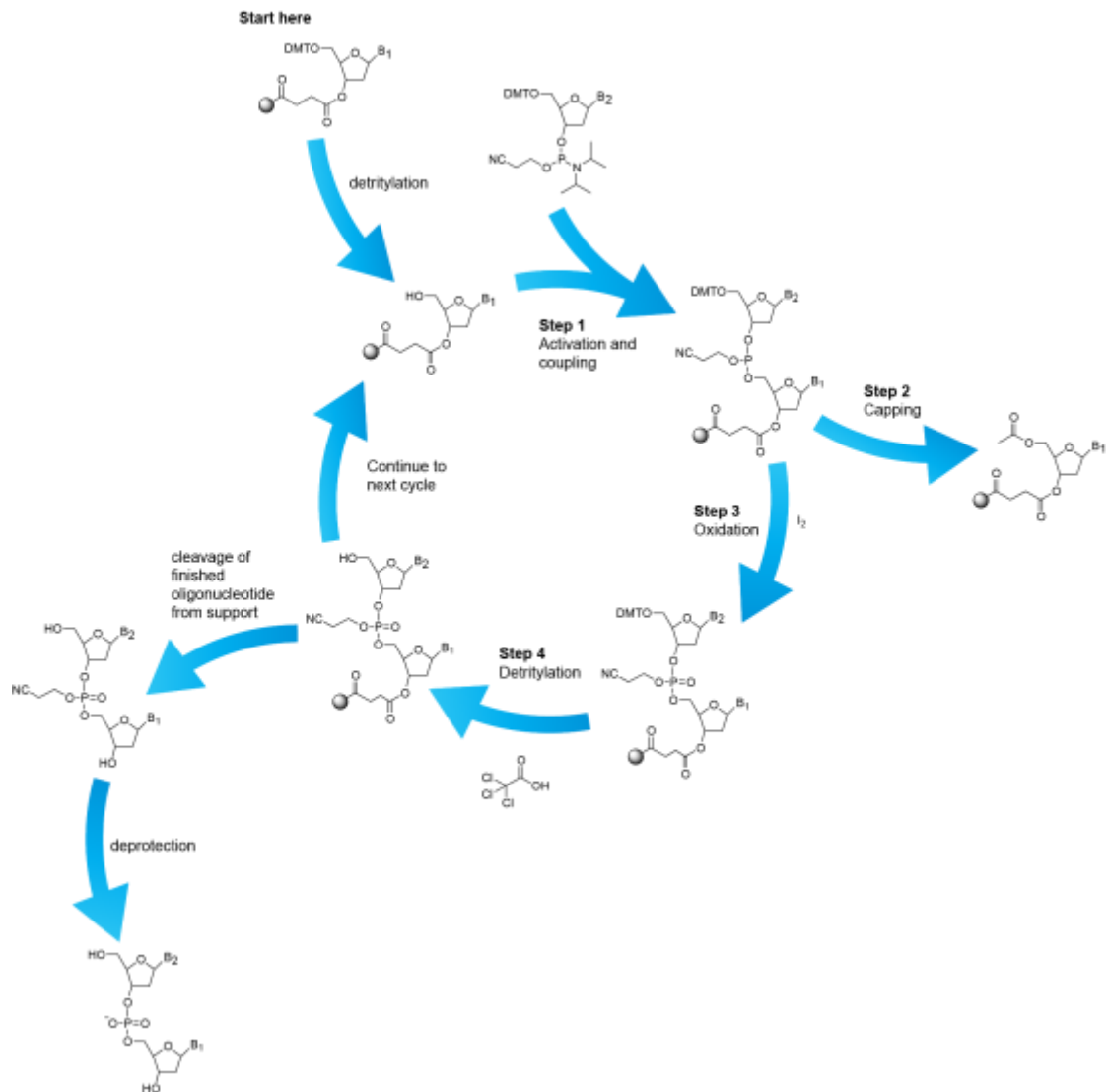
DNA-oligonukleotidit syntetisoidaan automatisoiduissa nukleiinihapposyntetisaattoreissa (ks. kuvio 6). DNA-oligonukleotidien synteesi tapahtuu sekvenssin 3'-päästä 5'-päähen eli päinvastoin kuin DNA-polymeraasit toimivat. Synteesi etenee sykleissä ja yksi nukleotidi lisätään kerrallaan ketjuun. Yleiskuva synteisistä on esitetty kuviossa 7. [3; 4.]



Kuvio 5. DNA-oligonukleotidin rakenne. Ketju muodostuu toisiinsa fosfaattitriesterisidoksin kiinnitetyistä nukleosideista [7].



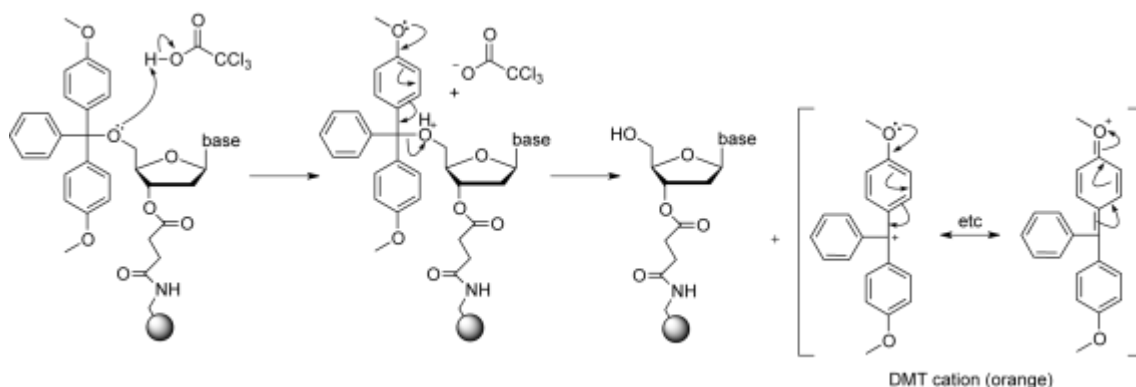
Kuvio 6. Esimerkkikuva 8-paikkaisesta syntetisaattorista.



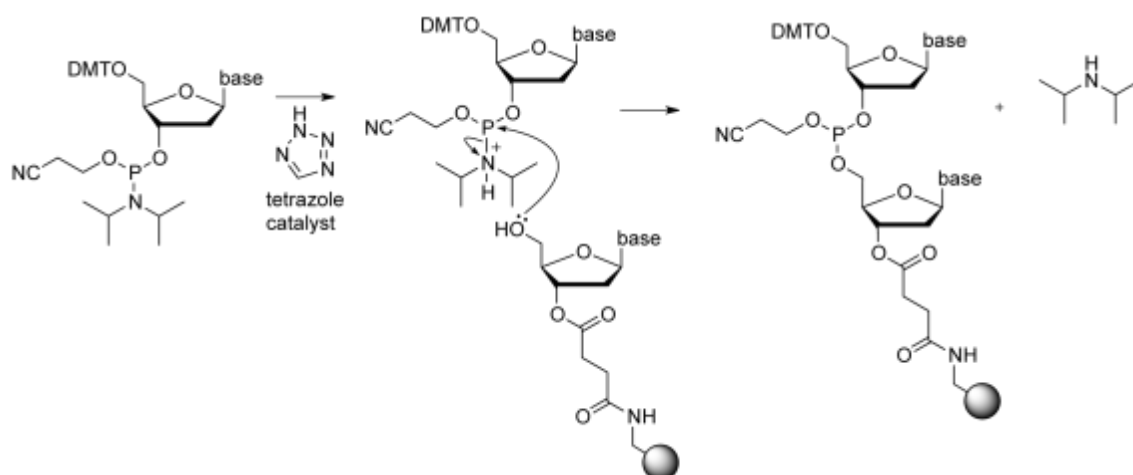
Kuvio 7. Yleiskuva oligosynteesistä. Syklin alussa (vaihe 1) nukleosidista irrotetaan suojausryhmä, joka muuten estäisi seuraavan nukleotidin liittymisen. Uuden nukleotidin liittämisen jälkeen ne oligoketjut, joihin ei liittynyt nukleotidia, blokataan (vaihe 2), kun taas ne ketjut, joihin nukleotidi liittyi, vahvistetaan hapettimella (vaihe 3). Tämän jälkeen sykli aloitetaan alusta suojausryhmän poistamisella (vaihe 4). Kun oligo on valmis, se irrotetaan kantajasta ja nukleotidien suojausryhmät poistetaan puhdistusta varten. [8.]

Synteesi aloitetaan asettamalla laitteeseen kolonni, jonka sisällä on CPG-kantajaan (controlled-pore glass, huokoinen lasihelmi) kiinnitettyä nukleosidia. Nukleosidien määrä riippuu halutusta synteesiskaalasta, joka vaihtelee 10 - 1000 nanomoolin välillä. Nukleosidin sokeriosan 3'-pään OH-ryhmä on sidottu esterisidoksella CPG-kantajaan ja emäsosa on suojattu kullekin nukleosidille ominaisilla suojausryhmillä. Sokeriosan 5'-pään OH-ryhmä on suojattu DMT-ryhmällä (4,4'-dimethoxytrityl). [8.]

Synteesin seuraavassa vaiheessa DMT-ryhmä puretaan lisäämällä kolonnin läpi trikloorietikkahappo-dikloorimetaaniliuosta (ks. kuvio 8). Tämän jälkeen sokeriosan 5'-pään OH-ryhmä on paljas reagoimaan. Kolmannessa vaiheessa lisätään uusi emäs nukleosidifosforamidiitin muodossa (ks. kuvio 9). Uuden nukleosidin 3'-päässä oleva fosforamidiittiryhmä reagoi edellisen nukleosidin sokeriosan vapaan 5'-pään OH-ryhmän kanssa tetrasolia tai imidatsoli-dikarbonitriliä sisältävässä asetonitriliiliuoksessa. Tämä katalyyttinä toimiva liuos protonoi lisättävän nukleotidin fosforamidiittiryhmän, jolloin nukleosidien välille muodostuu fosfiittidiesterisidos, jossa yksi fosfaattiryhmän happiatomeista on suojattu β -syanoetyyliryhmällä. [8; 9, s. 1114 - 1117.]

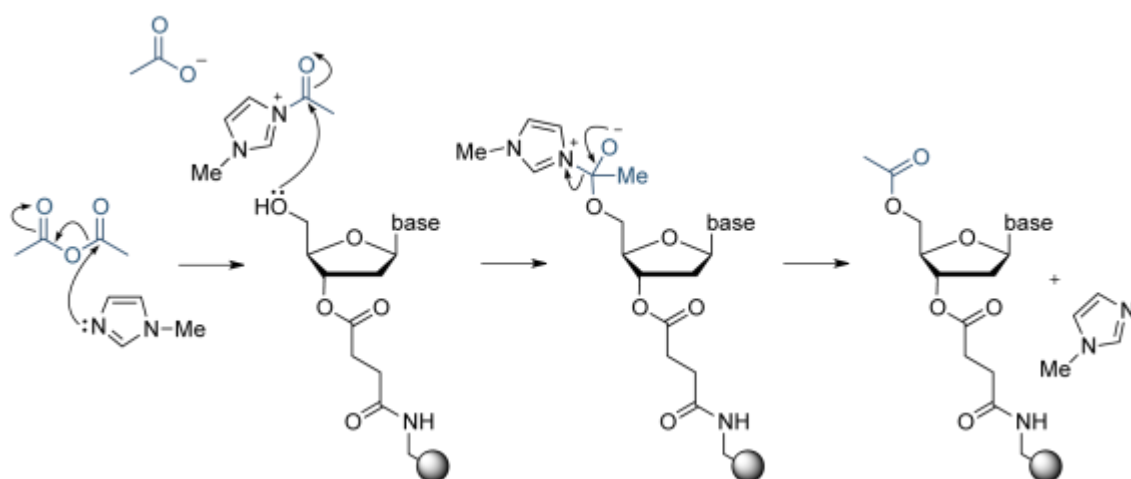


Kuvio 8. DMT-suojausryhmän irtoaminen nukleosidista [8].



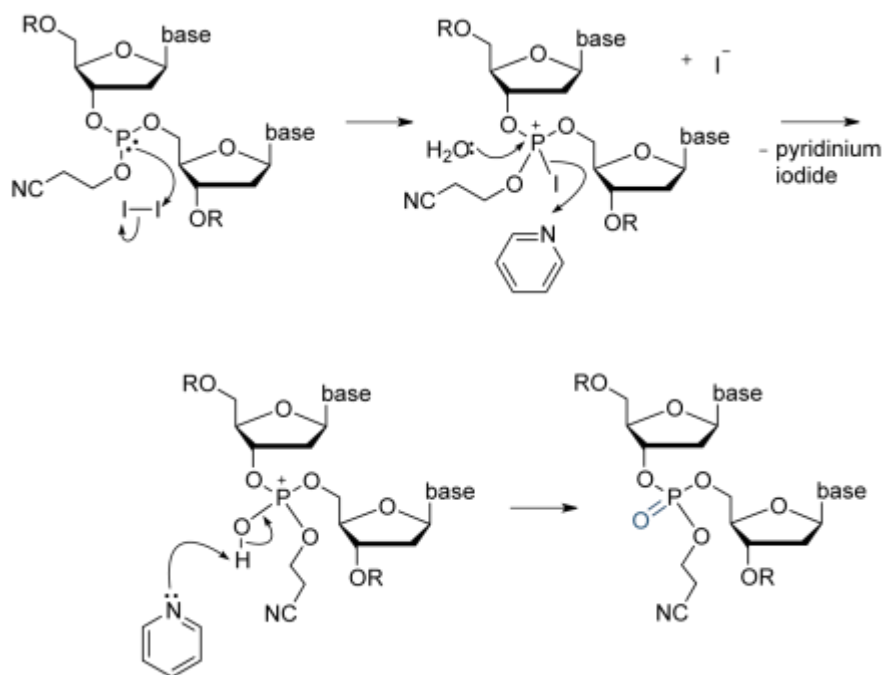
Kuvio 9. Uuden nukleotidin liittyminen ketjuun [8].

Nukleotidien liittyminen toisiinsa ei ole 100-%:sta, joten deleetioiden välttämiseksi reagoimattomat 5'-OH-ryhmät blokataan (ks. kuvio 10). Kolonniin lisätään kahta liuosta, jotka sisältävät etikkahappoanhydridiä, N-metyyli-imidatsolia, tetrahydrofuraania ja pyridiiniä. Reaktioseos asetyloi alkoholiryhmän, ja pyridiini varmistaa, että pH pysyy emäksisenä, jotta nukleotidin fosforamidiittiryhmä ei detrityloidu reaktiossa sivutuotteena syntyvän etikkahapon takia. 5'-OH-ryhmän asetylointi tekee katkenneesta ketjusta inertin, jolloin se ei enää reagoi seuraavissa vaiheissa. [8; 9, s. 1114 - 1117.]



Kuvio 10. Blokkauksreagenssien toiminta [8].

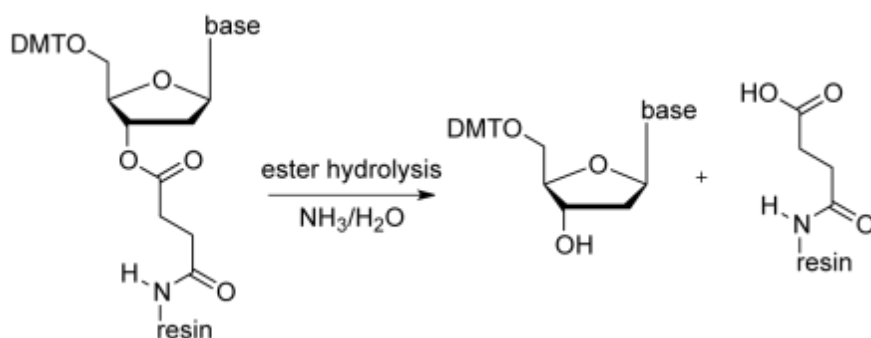
Viidennessä vaiheessa nukleotidien välille muodostunut fosfiittidiesterisidos hapetetaan fosfaattidiesterisidokseksi jodia, tetrahydrofuraania ja 2,6-dimetyylipyridiniä sisältävän vesiliuoksen avulla (ks. kuvio 11). Samalla ketjun rakenne stabiloituu. Fosfaatissa kiinni oleva syanoetyyliryhmä estää ei-toivottujen reaktioiden syntymisen seuraavien syklien aikana. [8; 9, s. 1114 - 1117.]



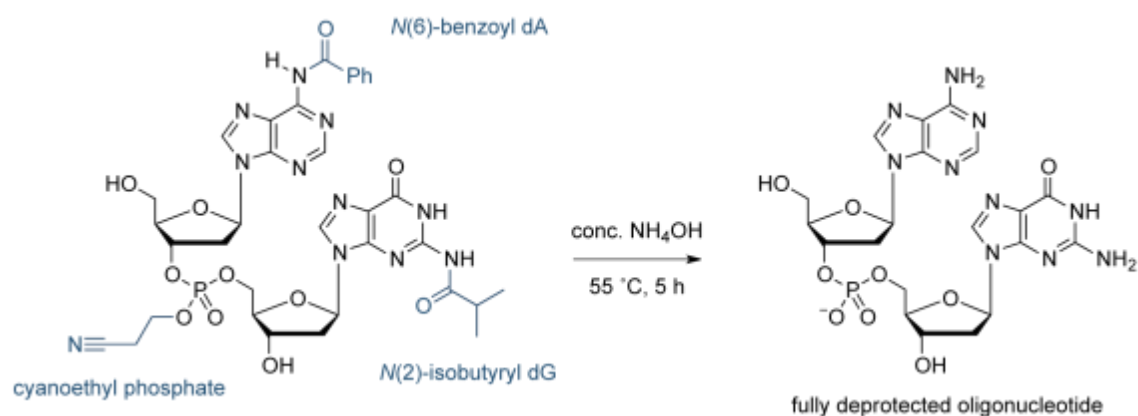
Kuvio 11. Hapettimen toiminta [8].

Ensimmäinen sykli on nyt valmis. Seuraavan syklin alussa DMT-suojausryhmä poistetaan, jolloin nukleotidin sokeriosan 5'-OH-ryhmä on jälleen valmis reagoimaan seuraavan nukleosidifosforamidiitin kanssa. Irronnut DMT-karbokationi muodostaa oranssin reaktiotuotteen, joka voidaan mitata 495 nm:n aallonpituudella. Värin voimakkuus on suoraan verrannollinen irronneiden DMT-ryhmien määrään, joten värin intensiteetin perusteella voidaan seurata synteesin etenemistä. [8.]

Ennen puhdistusta valmis oligo on deprotektoitava (ks. kuviot 12 - 13). Deprotektioolosuhteet vaihtelevat käytettyjen reagenssien mukaan, mutta kaikissa menetelmissä päätavoitteena on irrottaa valmis ketju CPG:stä ja poistaa ylimääräiset suojausryhmät. DMT-suojausryhmä poistetaan puhdistusmenetelmästä riippuen joko ennen puhdistusta tai puhdistuksen loppuksi. [4; 8.]



Kuvio 12. Oligon irrottaminen CPG:stä, esimerkkitapaus [8].



Kuvio 13. Emästen suojausryhmien irrottaminen, esimerkkitapaus [8].

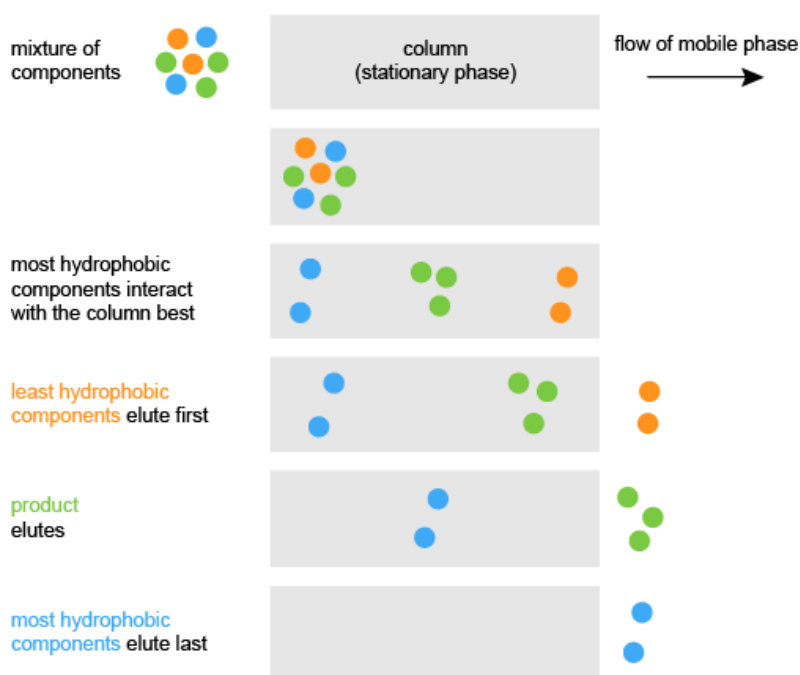
Laadunvalvonnan kannalta tärkeimmät asiat oligoiden synteesivaiheessa ovat tuoreiden reagenssien käyttö, laitteiden säännöllinen huolto ja oikeat deprotektio-olosuhteet. Nukleosidifosforamidiitit ja osa liuosreagensseista reagoivat helposti kosteuden kanssa, joten kuivausaineiden vaihto säännöllisin väliajoin edistää synteesin tehokkuutta ja vähentää esimerkiksi vajaamittaisten oligoiden syntymistä. Säännöllisillä huoltotoimenpiteillä pidetään syntetisaattorin linjastot puhtaina, jolloin reagenssit pääsevät virtaamaan esteettä. Oikeiden deprotektio-olosuhteiden myötä oligo irtaantuu CPG:stä ja suojausryhmät oligosta. Erityisen tärkeitä oikeat deprotektio-olosuhteet ovat modifioitujen oligoiden kohdalla, sillä esimerkiksi useiden leimojen fluorosointi aktivoituu vasta deprotektiovaiheessa. [4.]

4 DNA-oligonukleotidien puhdistus

4.1 Puhdistusmenetelmien kuvaus

DNA-oligonukleotidien puhdistamiseksi on olemassa useita erilaisia menetelmiä. Tässä luvussa on kuvattu kaksi yleisintä Oligomer Oy:llä käytössä olevaa puhdistusmenetelmää: RPC (reverse phase cartridge) ja HPLC (high performance liquid chromatography) eli korkean erotuskyvyn nestekromatografia. Molemmat menetelmät ovat niin sanottuja DMT-ON-menetelmiä, eli niissä oligon 5'-päässä olevaa DMT-ryhmää ei ole poistettu synteesivaiheessa, vaan poisto tapahtuu puhdistusmenetelmän lopuksi. Puhdistusmenetelmien tavoitteena on poistaa vajaamittaiset ja katkenneet oligot sekä deprotektion aikana syntyneet sivutuotteet oikeanmittaisten oligoiden seasta. [10; 11; 12; 13.]

Molemmat menetelmät perustuvat käänteisfaasikromatografiaan. Synteesissä käytettyjen nukleotidien DMT-suojausryhmän takia oligot ovat hyvin hydrofobisia. Tästä syystä käänteisfaasikolonnin stationäärifaasin pooliton materiaali sitoo itseensä tehokkaasti hydrofobiset oligot, jolloin poolinen liikkuva faasi eluo hydrofiilisemmät kontaminantit ensimmäisenä ulos kolonnista. Hydrofobisuuseroihin perustuvan erottelumenetelmän toimintaperiaate on havainnollistettu kuviossa 14. [11; 12; 13.]



Kuvio 14. Hydrofobisuuseroihin perustuvan kromatografian toimintaperiaate. Hydrofobisimmat partikkelit sitoutuvat tiukasti kolonnin poolittomaan stationääri faasiin, jolloin liikkuvan faasin poolisuutta muuttamalla saadaan eroteltua erilaiset partikkelit erilleen. [13.]

Käänteisfaasi-HPLC:ssä oligoiden ja kontaminanttien erottelu toisistaan perustuu liikkuvan faasin (trietyyliammoniasetaatti- ja asetonitriliiliuokset) muuttuvaan gradienttiin. HPLC-kolonnin stationääri faasin pooliton materiaali sitoo itseensä tehokkaasti täyspitkät DMT-suojatut oligot. Blokkauksen takia vajaamittaisissa oligoissa taas ei ole DMT-suojausryhmää jäljellä, vaan 5'-OH-ryhmä on asetyloitu. Tämän seurauksena poolinen liikkuva faasi eluoii hydrofiilisemmät kontaminantit, eli vajaamittaiset oligot ja deprotektion aikana irronneet suojausryhmät, ensimmäisenä ulos kolonnista. [13.]

Gradienttiajon avulla liikkuvan faasin hydrofobisuutta eli poolittomuutta saadaan nostettua, jolloin myös hydrofobiset täyspitkät oligot saadaan eluoitua kolonnista. Oligonukleotidit absorboivat 260 nm:n aallonpituudella ja fluoroforeilla modifioidut oligot fuoroforin aallonpituudella, joten fraktiot voidaan analysoida ja kerätä UV-Vis-detektorin avulla. HPLC-puhdistuksen jälkeen oligot puhdistetaan vielä RPC:n avulla DMT-suojausryhmän poistamiseksi. [4; 13.]

Kun HPLC:ssä puhdistus perustuu liikkuvan faasin muuttuvaan gradienttiin, tehdään RPC:ssä hydrofobisuuden muutos vaihtamalla liikkuvan faasin liuosta. RPC-puhdistuksen aluksi pylväs huuhdellaan asetonitrilillä, jolloin pylväässä olevat kontaminantit huuhtoutuvat pois ja pylvään absorptiomateriaali kostuu. Seuraavassa vaiheessa pylväs huuhdellaan TEAA:lla (trietyyliammoniumasetatti). TEAA toimii pylväässä ioniparina DMT-suojatuille oligoille, jolloin ne sitoutuvat paremmin pylvääseen. [11; 12.]

Puhdistettavan oligon sekaan lisätään ammoniumasetattia, jolloin muodostuu oligosuola-seos. Seoksen annetaan valua pylvään läpi, jolloin DMT-suojatut oligot sitoutuvat pylvääseen, ja vajaamittaiset suojaamattomat oligot ja deprotektion sivutuotteet valuvat nesteen mukana pois pylväästä. Seuraavaksi pylväs huuhdellaan laimealla ammoniakiliuoksella, joka estää jäljelle jääneiden suojaamattomien oligoiden sitoutumisen DMT-suojattuihin oligoihin ja pylvään absorptiomateriaaliin. Lopuksi pylväs huuhdellaan ionivaihdetulla vedellä ylimääräisten komponenttien poistamiseksi. [11; 12.]

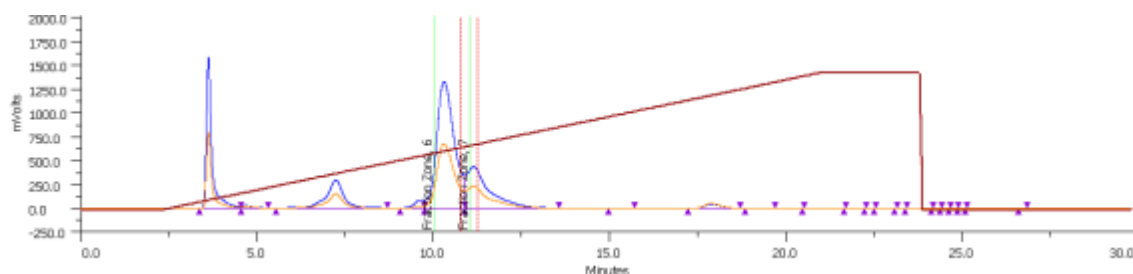
Tämän jälkeen poistetaan DMT-suojaus oligoista. Pylväs huuhdellaan TFA:lla (trifluorietikkahappo), jolloin DMT-ryhmä irtoaa oligosta. Irrotusvaiheen jälkeen pylväs huuhdellaan ammoniumformiaattiliuoksella TFA:n neutralisoimiseksi. Lopuksi pylväs huuhdellaan steriilillä vedellä. Viimeisenä vaiheena on puhdistetun oligon eluointi pylväästä asetonitrili-vesiliuoksella. Tämän jälkeen oligo on valmis saantomittausta ja kuivausta varten. Saanto mitataan OD (optical density) -lukuina UV-Vis-spektrofotometrin avulla. [4; 11; 12.]

4.2 HPLC:n hyödyntäminen laadunvalvonnassa

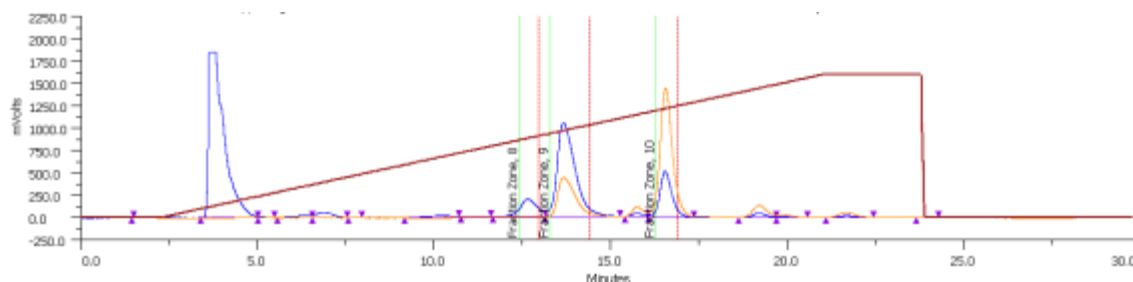
Puhdistusmenetelmistä erityisesti HPLC:tä käytetään myös yhtenä laadunvalvonnan välineenä. Kromatogrammien perusteella voidaan tehdä alustavia päätelmiä saannosta sekä tarpeesta tarkempaan laatuanalyysiin, sillä kromatogrammeissa näkyvät hyvin self-dimeerit, vajaamittaiset oligot sekä leimauksen onnistuminen. Kuvioissa 15 ja 16 on esitetty kahden erilaisen oligon HPLC-puhdistuksen kromatogrammit. Kuviossa 15 näkyy selvästi self-dimeerien vaikutus eluoitumiseen. Self-dimeerejä muodostavan oligon piikki on usein kaksihuippuinen tai häntivä. Aluke- ja self-dimeerit ovat yleensä PCR:n kannalta haitallisia, sillä ne vähentävät reaktioliuoksessa vapaana olevien alukkeiden määrää, mutta toisaalta esimerkiksi hairpin-tekniikkaa hyödyntävissä koettimis-

sa oligon kaksijuosteisuus on edellytys koettimen oikeanlaiselle toiminnalle. Kromatogrammeissa kaksihuippunen tai häntivä piikki voi merkitä myös huonolaatuista oligoa, sillä vaihtuvia emäksiä sisältävät oligot eluoituvat pidemmällä aikavälillä.

Kuviossa 16 on havainnollistettu HPLC-puhdistuksen tärkeys ja hyöty leimattujen oligoiden kohdalla. Fluoroforien ja sammuttajien vuorovaikutuksiin perustuvilla koettimilla vialliset oligot aiheuttavat vääriä signaaleja tai signaalin puuttumisen. Tästä syystä koettimien HPLC-puhdistuksen kohdalla on erityisen tärkeää osata tulkita kromatogrammia oikein, jotta haluttu lopputuote voidaan erottaa virheellisten fraktioiden joukosta.



Kuvio 15. Self-dimeerien vaikutus eluotumiseen. Self-dimeerejä muodostavan oligon kromatogrammi on usein kaksihuippunen tai häntivä. Kaksijuosteisuus vaikuttaa merkittävästi myös HPLC:n jälkeiseen RPC-puhdistukseen, sillä kaksijuosteinen oligo sitoutuu kiinni pylvään absorbtiomateriaaliin, eikä eluoidu helposti. Tämä taas pienentää saantoa. Kromatogrammissa näkyy hyvin myös noin 7 minuutin kohdalla eluotuneet vajaamittaiset oligot.



Kuvio 16. Erään leimatun oligon kromatogrammi. Erityisesti modifioiduilla oligoilla HPLC toimii tehokkaana puhdistusmenetelmänä. Noin 12 minuutin kohdalla on leimautumaton oligo ja noin 16 minuutin kohdalla on haluttu lopputuote, jossa leimaus on onnistunut. Pääpiikin jälkeen kolonnista on eluotunut myös ylimääräinen leimareagenssi.

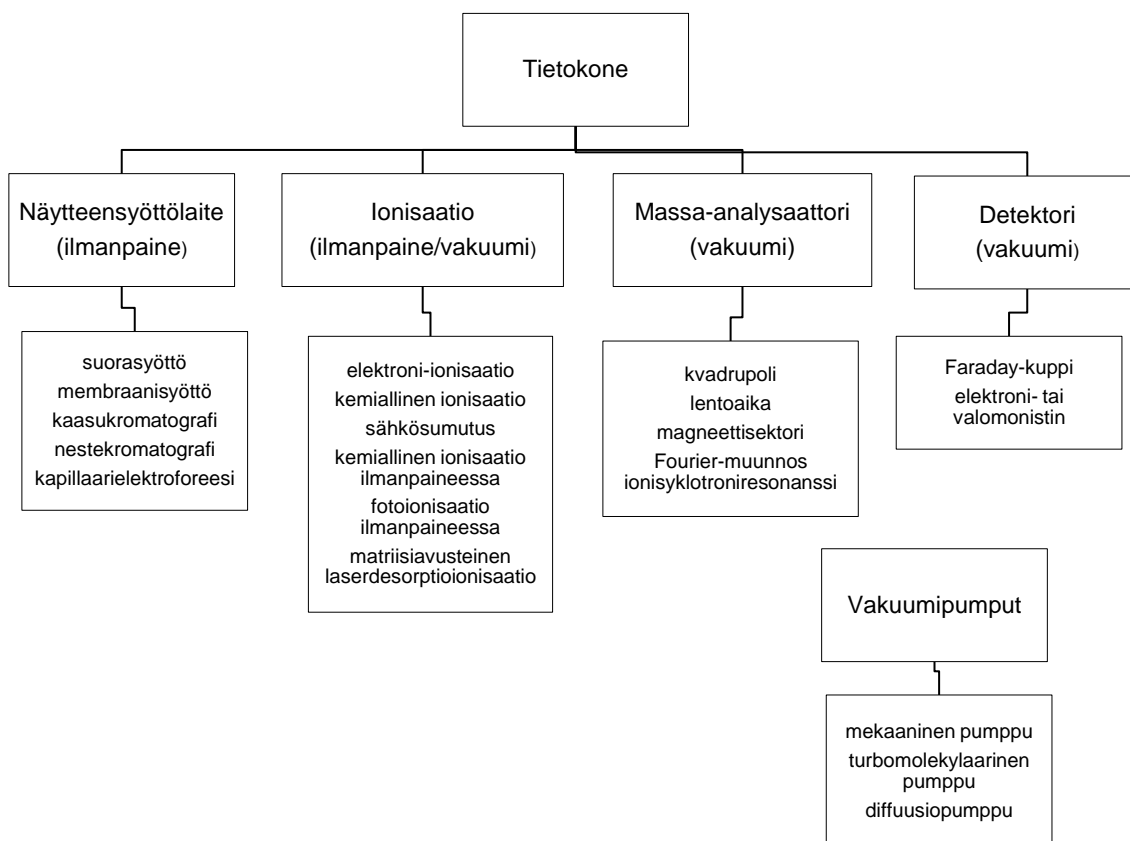
5 DNA-oligonukleotidituotannon laadunvalvonta MALDI-TOF-menetelmällä

5.1 Yleistä tietoa massaspektrometriasta

Massaspektrometria on analyttinen mittaustekniikka, jota hyödynnetään epäorgaanisten ja orgaanisten yhdisteiden tunnistamisessa ja niiden pitoisuuksien määrittämisessä. Massaspektrometria perustuu ionisoitujen molekyylien massa/varaus-arvojen (m/z) intensiteetin mittaamiseen. Massaspektrometri koostuu pääosin kuviossa 17 kuvatuista osista. Näytteenäytölaitteella tutkittavat analyytit saadaan eroteltua erilleen toisistaan ja johdettua yksitellen massaspektrometrin ionisaattoriin. Ionisaattorissa analyytit ionisoidaan molekyyli-ioneiksi, joilla on ylimääräistä energiaa. Energian vaikutuksesta ionisoituneen molekyylin sidokset katkeavat ja molekyyli-ioni pilkkoutuu pienemmiksi massafragmenteiksi. [14, s. 15; 15, s. 122.]

Molekyylit voivat ionisoitua joko luovuttamalla tai vastaanottamalla elektronin, jolloin muodostuu radikaalikationeja tai -anioneja, tai luovuttamalla tai vastaanottamalla protonin, jolloin muodostuu deprotonoituja tai protonoituja molekyylejä. Addukti-ioneja muodostuu silloin, kun molekyyli vastaanottaa muun varauksellisen atomin tai molekyylin. Koska ionisoitavassa molekyylissä on useita kohtia, jotka voivat luovuttaa tai vastaanottaa elektronin, protonin tai varauksellisen ryhmän, voi molekyylistä syntyä moninkertaisesti varautuneita ioneja. Massaspektrometriassa näytemolekyylien ionisoinnilla on tärkeä rooli, sillä yhdisteen massaspektrissä näkyvät vain syntyneet ionit. Neutraaleja molekyylejä tai niiden osia massaspektrometri ei havaitse. [14, s. 17.]

Massa-analysaattorissa massafragmentit erotellaan toisistaan niiden m/z -suhteen mukaan. Erottelu tapahtuu sähkö- ja magneettikenttien avulla. Mitä kauemmin ionit viipyvät analysaattorissa, sitä tarkemmin erottelu tapahtuu. Tämän jälkeen massafragmenttien intensiteetit mitataan detektorilla. Signaalien voimakkuuden perusteella muodostetaan tutkittavan analyytin massaspekttri, jota voidaan verrata tunnettujen yhdisteiden kirjastospektreihin. Massaspektrometrilaitteistot toimivat osittain vakuuissa, joka tuotetaan vakuumpumppujen avulla. [14, s. 15; 15, s. 122 - 123, 125 - 127.]



Kuvio 17. Massaspektrin osat [14, s. 15].

5.2 MALDI-TOF-menetelmä

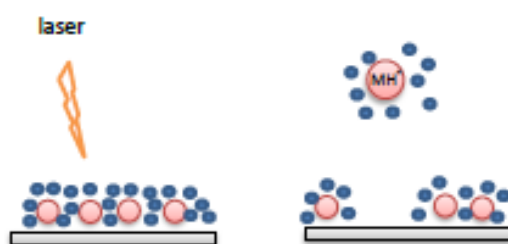
Matriisiavusteinen laserdesorptioionisaatio (matrix assisted laser desorption/ionisation, MALDI) on suunniteltu erityisesti suurten, haihtumattomien ja poolisten yhdisteiden massaspektrometriseen analysointiin. Tyypillisimpiä analysoitavia yhdisteitä ovat biopolymeerit, kuten peptidit, proteiinit, oligonukleotidit ja oligosakkaridit, mutta myös muiden yhdisteiden, kuten porfyriinien, fullereenien, dendrimeerien, hiilitervojen sekä humus- ja fulvohappojen, analysointi onnistuu hyvin. MALDI:n ionisaatiossa voi muodostaa sekä positiivisia että negatiivisia ioneja. Moolimassaltaan alle 50 000 Da:n yhdisteet ionisoituvat pääasiallisesti yhdesti varautuneina, kun taas suuremmat yhdisteet muodostavat myös useasti varautuneita ioneja. [14, s. 84 - 86.]

MALDI:n ionilähde koostuu kahdesta elektrodista: linssielektrodista ja siitä 1 - 2 cm:n etäisyydellä olevasta metallielektrodista. Metallielektrodi eli näytelevy on korkeajännitteinen, positiivisesti tai negatiivisesti varautunut levy, jota käytetään ionien ulospulsaamiseen ionilähteestä. Ajon aikana näytelevyyn asetettu kiihdytysjännite pidetään noin +20/-20 kV:ssa riippuen siitä, analysoidaanko positiivisia vai negatiivisia ioneja. Näytteiden ionisointi tapahtuu laserpulssien avulla. Tavallisimmat laserit ovat UV-, IR- tai tyypilasereita. Laserin jälkeen MALDI-laitteistossa on vaimennin, jolla säädetään säteen tehoa, linssistö, jolla säde fokusoidaan, ja peilejä, joiden avulla lasersäde ohjataan ionilähteen näytelevylle. [14, s. 85.]

MALDI:n ionisaatiossa hyödynnetään pienimolekyyllisiä, heikosti haihtuvia ja kiinteistä yhdisteistä koostuvia matriiseja, jotka absorboivat ionisaatiossa käytetyn lasersäteen energian aallonpituutta. Tyypillisimmät matriisit ja niiden käyttökohteet on koottu taulukkoon 1. MALDI:ssa tutkittava analytti ja matriisi muodostavat yhdessä näytelevylle kiinteän pisaran, jossa matriisi toimii liuottimena ja eristää analyttimolekyylit toisistaan. Matriisi absorboi laserpulssin energiaa ja virittyy. Virittyminen aiheuttaa matriisimolekyylien haihtumisen, jolloin samalla analyytit siirtyvät kaasufaasiin ja ionisoituvat. Havainnekuva positiivisesta ionisaatiosta on kuviossa 18. [14, s. 84 - 87; 16, s. 18 - 20; 17, s. 102 - 107.]

Taulukko 1. Yleisimmät MALDI-matriisit ja niiden käyttökohteet [16, s. 19].

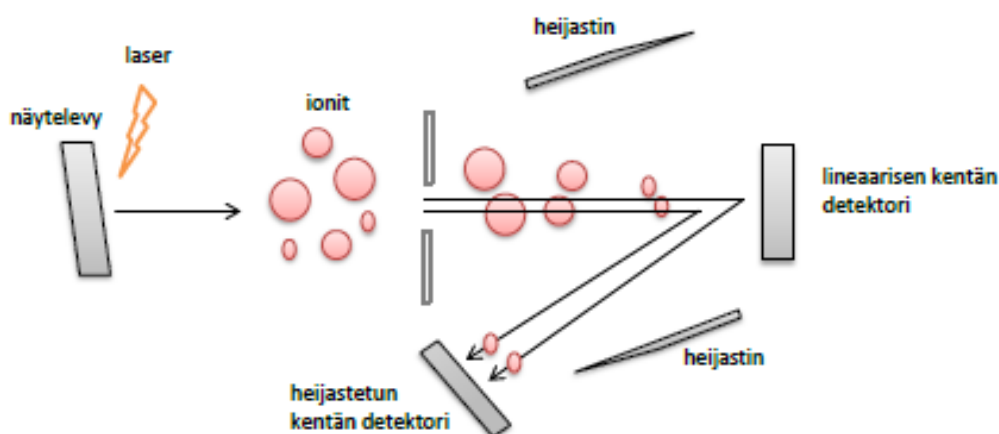
Matriisi	Laserin aallonpituus	Käyttökohte
Nicotinic acid	UV 266 nm	Proteiinit, peptidit, adduktien muodostuminen
2,5-Dihydroxybenzoic acid (plus 10% 2-hydroxy-5-methoxybenzoic acid)	UV 337 nm, 353 nm	Proteiinit, peptidit, hiilihydraatit, synteettiset polymeerit
Sinapinic acid	UV 337 nm, 353 nm	Proteiinit, peptidit
α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid	UV 337 nm, 353 nm	Peptidit, fragmentoituminen
3-Hydroxy-picolinic acid	UV 337 nm, 353 nm	Nukleiinihapot
6-Aza-2-thiothymine	UV 337 nm, 353 nm	Proteiinit, peptidit, ei-kovalenttiset yhdisteet; pH lähellä neutraalia
k,m,n-Di(tri)hydroxyl-acetophenone	UV 337 nm, 353 nm	Proteiinit, peptidit, ei-kovalenttiset yhdisteet; pH lähellä neutraalia
Succinic acid	IR 2,94 μm , 2,79 μm	Proteiinit, peptidit
Glycerol	IR 2,94 μm , 2,79 μm	Proteiinit, peptidit, nestemäisen matriisi



Kuvio 18. Matriisiavusteinen ionisaatio. Kuviossa siniset pisteet kuvaavat matriisia ja punaiset analyyttejä. [17, s. 102 - 107; 18.]

Kaasufaasissa olevat ionit erotellaan toisistaan lentoaikamassa-analysaattorin (time-of-flight, TOF) avulla. TOF-laitteessa ionit ohjataan lentoaikaputkeen, jossa ionit lentävät vapaasti ilman voimakenttien vaikutusta. Lentoaikaputkessa ionien erottelu tapahtuu ionien massojen perusteella. Pienet ionit lentävät putken läpi nopeammin detektorille kuin raskaammat ionit. [18; 19; 20, s. 50 - 51.]

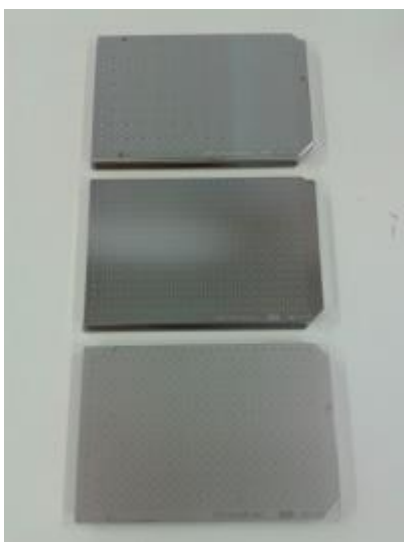
Lentoaikaputkessa ionit voivat lentää detektorille suorassa linjassa tai erottelussa voidaan hyödyntää heijastavaa laitteistoa. Heijastavassa laitteistossa ionien liike hidastetaan lentoaikaputken päässä esimerkiksi sähkökentän avulla ja ionit käännytetään lentämään takaisin lentoaikaputkeen. Heijastava laitteisto parantaa resoluutiota, sillä saman m/z -suhteen omaavilla ioneilla voi olla eri määrä liike-energiaa. Hidastavan kentän avulla ne ionit, joilla on enemmän liike-energiaa, työntyvät syvemmälle ioniheijastimeen kuin ne ionit, joilla on vähemmän liike-energiaa. Sijoittamalla detektorin sopivaan kohtaan lentoaikaputkessa saadaan molemmat ionit saapumaan sille yhtä aikaa. Havainnekuva lineaarisen ja heijastavan laitteen toiminnasta on kuviossa 19. Esimerkkikuvat MALDI-TOF-laitteistosta ja analyysissä käytettävistä näytelevyistä ovat kuvioissa 20 - 21. [18; 19; 20, s. 50 - 51; 21.]



Kuvio 19. Lineaarisen ja heijastavan lentoaikaputken toiminta. Lineaarisessa mittauksessa ionit lentävät suoraan detektorille, kun taas heijastavan laitteen avulla ionien lentorataa muutetaan. [18; 19; 20, s. 50 - 51; 21.]



Kuvio 20. Bruker Daltonicsin Autoflex-merkkinen MALDI-TOF-analyysilaite.



Kuvio 21. MALDIn näytelevyjä. Ylimpänä harjattu teräslevy, keskellä alumiinilevy ja alimpana mattapintainen teräslevy.

5.3 DNA-oligonukleotidien MALDI-TOF-massa-analysointi (vain työn tilaajan käyttöön)

6 Työn toteutus, tulokset ja niiden tarkastelu

6.1 Lähtötilanteen kuvaus ja opinnäytetyön tavoitteet

Lähtötilanteen mukaan harjatulle teräslevylle pipetoitiin käsin 0,5 - 0,7 µl matriisia ja annettiin kuivua. Tämän jälkeen pisaran päälle pipetoitiin OD-levyltä 0,5 - 0,7 µl näytettä ja annettiin kuivua. Valmis levy siirrettiin MALDI-TOF-laitteeseen ja näytteet analysoitiin yksitellen. Käytetty matriisi oli nukleiinihapoille suositeltu 3-hydroksipikoliinihappo. [4.]

Lähtötilanteen MALDI-TOF-työmenetelmä oli toimiva ja nopea, kun analysoitavia laadunvalvontanäytteitä oli vähän. Isommilla näytemäärillä käsinpipetointi oli kuitenkin työlästä ja pipetointivirheen riski kasvoi. Myös pipetointiin tarvittava aika lisääntyi näytemäärien kasvaessa.

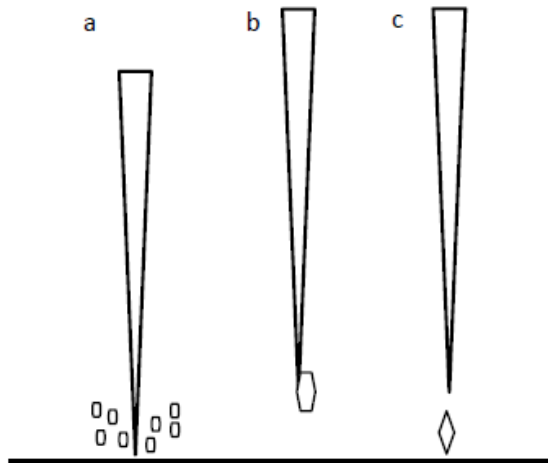
Opinnäytetyön tarkoituksena oli automatisoida DNA-oligonukleotidituotannon MALDI-TOF-massa-analyysiin perustuva laadunvalvonta. Tavoitteena oli luoda pipetointirobotia ohjaava metodi, jonka avulla matriisi ja laadunvalvontanäytteet saataisiin pipetoitua automatisoidusti näytelevylle. Lisäksi tavoitteena oli tutkia, pystyikö nykyisellä MALDI-TOF-laitteen ohjelmistoversiolla luomaan metodin, jonka avulla laadunvalvontanäytteet voisi analysoida automaattisesti.

Työn toteutus jakautui neljään kokonaisuuteen. Ensimmäisenä luotiin matriisin ja laadunvalvontanäytteiden pipetointiohjelma pipetointirobotille. Seuraavana tarkasteltiin eri näytelevyjen ja näytteen konsentraation vaikutusta näytelevylle muodostuneisiin näytepisaroihin. Kolmantena vaiheena oli MALDI-TOF-analyysin automatisoinnin tarkastelu. Viimeinen kokonaisuus oli työohjeiden kirjoitus. Työn toteutus on kuvattu osissa. Kukin vaiheen tulokset vaikuttivat suuresti seuraavan vaiheen suunnitteluun ja toteutukseen, joten tulosten tarkastelu on sijoitettu työn toteutuksen kuvauksen yhteyteen.

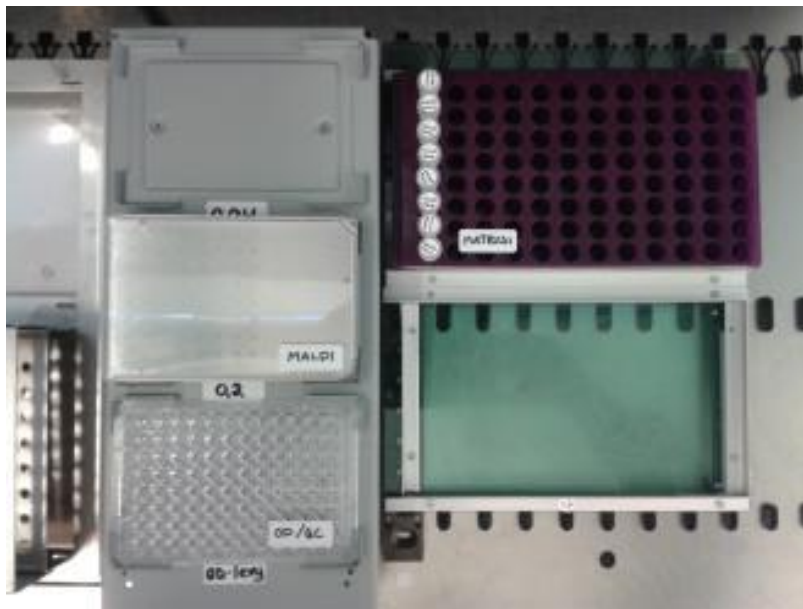
6.2 Pipetointirobotin ohjelmointi

Pipetointirobotin ohjelmointi aloitettiin luomalla ohjelmaan tarvittavat levy- ja putkitiedot sekä asettamalla niiden sijainnille koordinaatit. Näiden tietojen perusteella laitteen ohjelma pystyi liikuttamaan nesteenkäsittelykättä laitteen sisällä oikeille kohdille. Seuraavana vaiheena luotiin käsiteltäville nesteille oikeanlaiset nesteluokat. Käytössä olevan nesteenkäsittelykäden pipetointikärjet on suunniteltu suuremmille nestemäärille, joten nesteluokkien luomisessa oli erityisesti huomioitava se, ettei ohjelma antaisi virhesignaalia, kun pipetoitava nestemäärä alittaa suositusrajan. Lisäksi nesteluokkien luomisessa oli myös huomioitava nestepinnan tunnistus ja pipetoitavan nesteen viskositeetti sekä mahdollinen vaahtoaminen tai sakkautuminen.

Kun koordinaatit ja nesteluokat oli luotu, aloitettiin matriisin pipetoinnin testaus näytelevylle. Koska pipetoitavat määrät olivat pieniä, jouduttiin nesteen imu- ja pipetointitilavuuksia sekä pipetointinopeutta optimoimaan. Liian pienillä nestemäärillä ja pipetointinopeudella nestepisara ei irronnut kärjestä, kun taas liian suurilla nestemäärillä ja pipetointinopeudella pisara pirskahti levyille. Myös nesteenkäsittelykäden kärkien etäisyydellä näytelevyn pinnasta oli suuri vaikutus. Pipetoinnin haasteellisuus ja tavoite on havainnollistettu kuviossa 22. Optimoinnin jälkeen luotiin ohjelma, jonka avulla laadunvalvontanäytteet saatiin pipetoitua näytelevylle automatisoidusti. Pipetointirobotti ja välineiden sijaintikuva ovat kuvioissa 23 - 24.



Kuvio 22. Pipetoinnin optimointi. Kohdassa a kärjet olivat liian lähellä levyä ja pipetointinopeus liian voimakas. Tämän seurauksena pisara hajosi levyllä. Kohdassa b taas kärki oli liian ylhäällä ja pipetointinopeus liian alhainen. Tällöin pisara ei irronnut kärjestä. Kohdassa c on kuvattu optimaalinen tilanne.



Kuvio 23. Matriisiputkien, näytelevyn ja laadunvalvontanäytteiden sijaintipaikat.



Kuvio 24. Tecan Freedom EVO-pipetointirobotti. Laitetta ohjattiin Freedom EVOware version 2.4 -ohjelmalla.

6.3 MALDI-TOF-analyysin automatisointi

6.3.1 Eri näytelevyjen ja näytekonsentraation testaus

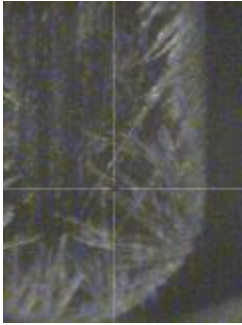
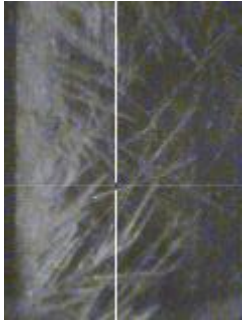
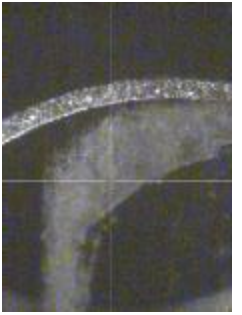
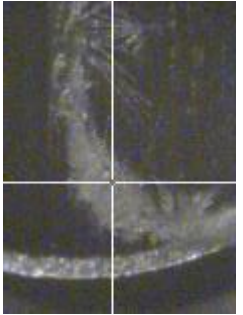
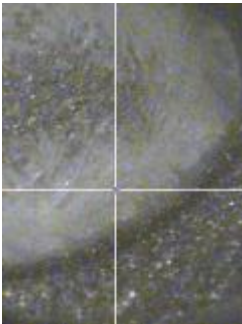
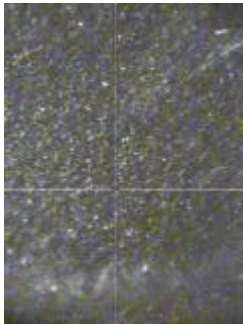
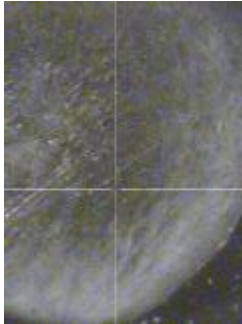
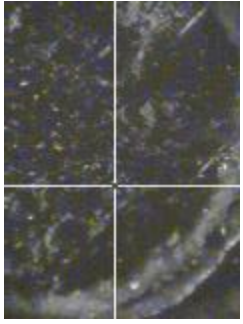
Matriisin ja näytteen epätasainen kuivuminen näytelevylle muodosti suurimman haasteen massa-analyysin automatisoinnille. Kuten käsinpipetoinnissakin, myös pipetointirobotilla matriisi kuivui näytelevylle homogeeniseksi pisaraksi, mutta näytteen lisäämisen jälkeen matriisinäytepisara kuivui siten, että näyte kiteytyi pisaran ulkoreunoille ja pisaran keskus jäi tyhjäksi. Koska automatisoidussa ajossa lasersäde säädettiin näytepintaa tietyn kuvion mukaisesti ja lasersäteen osuminen pisaran reuna-alueelle oli sattumanvaraista, aiheutti pisaran keskellä oleva tyhjä tila runsaasti hylättyjä taustaspektrejä. Tästä syystä ennen ajometodin luomista testattiin, vaikuttiko näytteen konsentraatio tai näytelevymateriaali pisaran kuivumismuotoon.

Konsentraation ja näytelevymateriaalin vaikutuksia tutkittiin toistokokeilla. Eri näytekonsentraatiota pipetoitiin eri näytelevylle useisiin kohtiin ja niitä tarkasteltiin MALDI-TOF-laitteen kameran ja mittausten avulla. Testauksessa kolmelle eri näytelevylle pipetoitiin näytteet käsin sekä pipetointirobotilla OD-levyltä ja eluutiolevyltä. OD-levyllä näyte oli laimennettu ionivaihdetulla vedellä. Levyt olivat käytössä ollut hiottu teräslevy, mattapintainen teräslevy ja alumiinilevy. Testien tulokset on koottu taulukkoon 2.

Konsentraatiolla ei ollut merkittävää vaikutusta pisaran kuivumismuotoon tai massaspektrin laatuun, mutta eluutiolevyltä otetuista näytteestä oli vaikeampi saada kunnollista signaalia. Myöskään eri levymateriaaleilla ei ollut vaikutusta massaspektrin laatuun, sillä kaikista kolmesta levystä saatiin hyvät massapiikit. Pisaran kuivumismuodoissa ei ollut automatisoinnin kannalta merkittäviä eroja. Mattapintainen teräslevy oli kuitenkin kolmesta levystä selvästi huonoin vaihtoehto, sillä levyn tausta vaikeutti pisaran havaitsemista. Käsinpipetoidun ja pipetointirobotin pisarajäljissä ei ollut eroja, joten luotu pipetointiohjelma toimi hyvin.

Metodin luomiseen valittiin testien perusteella hiottu teräslevy, eli sama levy, jota oli käytetty manuaalisesti tarkistettujen laadunvalvontanäytteiden analysoinnissa. Myös näytteen konsentraation annettiin olla sama kuin ennen, eli laadunvalvontanäytteet otettiin OD-mittauslevyltä. Tämän myötä myöskään puhdistus- ja laadunvalvontaprosessiin ei tarvinnut tehdä suuria muutoksia.

Taulukko 2. Testauksen tulokset.

Selite	Kuva A	Kuva B
<p>Matriisin pipetoinnin testaus harjatulle teräslevylle.</p> <p>Kuvassa A on käsinpipetoitu matriisi ja kuvassa B nesteenkäsittelijällä pipetoitu matriisi. Merkittävää eroa matriisipisaroissa ei ollut, joten tämän suhteen automatisointi toimi hyvin. Harjatulle teräslevylle matriisi kuivui kidereunaisena renkaana.</p>		
<p>Näytepitoisuuden vertailu harjatulla teräslevyllä.</p> <p>Kuvassa A näyte on eluutioliuoksesta ja kuvassa B OD-levyltä. Pisaran kuivumismuodon kannalta ei ollut eroja, mutta eluutioliuoksesta otetusta näytteestä oli vaikeampi saada signaalia. Testejä jatkettiin täten OD-levyltä otetuilla näytteillä. Harjatulle teräslevylle matriisi ja näyte kuivuivat leveänä renkaana.</p>		
<p>Mattapintaisen teräslevyn testaus.</p> <p>Kuvassa A on matriisipisara ja kuvassa B matriisi ja näyte. Mattalevylle muodostui tasainen matriisipisara, mutta näytteen lisäämisen jälkeen näytteen havaitseminen levyn taustasta oli hankalaa. Ei toivottua parannusta näytteen kuivumismuodon suhteen.</p>		
<p>Alumiinilevyn testaus.</p> <p>Kuvassa A on matriisipisara ja kuvassa B matriisi ja näyte. Myös alumiinilevylle muodostui tasainen matriisipisara, mutta näytteen lisäämisen jälkeen tälläkin levymateriaalilla näytepisara kuivui epätasaisesti.</p>		

6.3.2 Ajometodin luominen ja näytetietojen siirto ohjelmaan

Ajometodin luomisessa haasteena oli näytteen epätasainen kuivuminen näytelevylle sekä ohjelman käyttöohjeiden puuttuminen. Metodin luomisessa sovellettiin uudemman ohjelmistoversion käyttöohjeita. Metodi luotiin optimoimalla ajoparametreja useiden testiajojen avulla.

MALDI-TOF-laitteelle saatiin luotua metodi, jonka avulla laadunvalvontanäytteet voitiin mitata ohjelmoidusti ja saatu mittaustiedosto tallennettua tiedostoon. Metodi ei kuitenkaan toiminut aukottomasti näytteiden epätasaisen kuivumisen takia, vaan joistain näytteistä massaspektri saattoi olla huonolaatuinen tai puuttua kokonaan. Tästä syystä laadunvalvontanäytteiden automatisoitua massa-analyysimenetelmää ei saatu optimoitua toivotulle tasolla. Luotua metodia voitiin kuitenkin käyttää, sillä puuttuvat tai huonolaatuiset massaspektrit oli helppo tarkistaa ja analysoida manuaalisesti uudelleen. Lisäksi luotua metodia voi jatkossa käyttää pohjana, mikäli näytteet saadaan kuivumaan tasaisesti näytelevylle.

Automatisoitua ajoa varten tarvittiin myös helppo tapa siirtää näytetiedot MALDI-TOF-laitteen ohjelmaan. Ohjelmisto luki vain tietynlaisia tekstitiedostoja, joten näytetietojen siirtoa varten piti luoda oma tiedosto, johon näytetiedot oli helppo siirtää tilausjärjestelmästä. Mac-tietokoneella luodut tiedostot eivät olleet yhteensopivia MALDI-TOF-laitteen Windows XP-käyttöjärjestelmän kanssa, joten näytetietojen siirto piti tehdä Windows XP-käyttöjärjestelmän avulla.

7 Pohdinta

Opinnäytetyön tarkoituksena oli automatisoida DNA-oligonukleotidituotannon MALDI-TOF-massa-analyysiin perustuva laadunvalvonta. Lähtötilanteen käytäntö eli matriisin ja laadunvalvontanäytteiden käsinpipetointi näytelevylle ja näytteiden yksittäinen analysointi koettiin työlääksi ja riskialttiiksi, joten opinnäytetyön tavoitteena oli luoda pipetointirobottia ohjaava metodi, jonka avulla matriisi ja laadunvalvontanäytteet saataisiin pipetoitua automatisoidusti näytelevylle. Lisäksi tavoitteena oli tutkia, pystyikö MALDI-TOF-laitteen ohjelmistoversiolla luomaan metodin, jonka avulla laadunvalvontanäytteet voitaisiin analysoida automaattisesti.

Pipetointirobotin ohjelmointi matriisin ja laadunvalvontanäytteiden pipetoinnille näytelevylle onnistui hyvin. Ajallisesti pipetointi robotilla vei enemmän aikaa kuin käsinpipetointi, mutta pipetoitavien näytteiden määrää voitiin kasvattaa sekä käsinpipetoitiin käytetty työaika voitiin nyt hyödyntää muuten. Myös MALDI-TOF-laitteelle saatiin luotua metodi, jonka avulla laadunvalvontanäytteet voitiin mitata ohjelmoidusti ja saatu mittausdata tallennettua tiedostoon. Massa-analyysin optimaalisen automatisoinnin esteeksi muodostui kuitenkin sama ongelma, joka oli hidastanut myös aiemmin laadunvalvontanäytteiden analysointia. Matriisinäytepisaran kuivumismuodon takia lasersäteen osuminen pisaran näytealueelle oli sattumanvaraista ja automaattinen analyysi antoi hylättyjä taustaspektrejä.

Luotua metodia voitiin kuitenkin hyödyntää esimerkiksi suurien laadunvalvontanäyttemäärien massa-analyyseissa. Metodin antamat huonot massaspektrit voitiin tarkistaa yksitellen ajon jälkeen. Luotua metodia ja työohjeita voi myös hyödyntää jatkossa uuden metodin pohjana, mikäli esimerkiksi eri matriisin avulla saadaan muodostettua taisaisempi pisara. Kokonaisuudessaan opinnäytetyön toteutus onnistui hyvin ilman suuria ongelmia. Työlle asetetut tavoitteet saavutettiin ja työn tuloksia voitiin hyödyntää Oligomer Oy:n DNA-oligonukleotidituotannon MALDI-TOF-laadunvalvonnassa.

Lähteet

- 1 Oligomer Oy. Yritys. 2014. Verkkodokumentti. <<http://www.oligomer.fi/fi/yritys>>. Luettu 22.3.2014.
- 2 Oligomer Oy. Mikä on oligonukleotidi? 2014. Verkkodokumentti. <<http://www.oligomer.fi/fi/tietopankki/5/mika-on-oligonukleotidi-1>>. Luettu 22.3.2014.
- 3 Oligomer Oy. Miten oligot syntetisoidaan? 2014. Verkkodokumentti. <<http://www.oligomer.fi/fi/tietopankki/5/how-are-oligos-synthesized>>. Luettu 22.3.2014.
- 4 Laakso, Matti, Koski, Mari, Dufva, Anu & Selin, Maiju. Oligomer Oy:n menettelytapaohjeet 2003 - 2014.
- 5 Suominen, Ilari & Ollikka, Pauli. 2006. Yhdistelmä-DNA-tekniikan perusteet. Helsinki: Opetushallitus.
- 6 Suominen, Ilari, Pärssinen, Raimo, Haajanen, Kari & Pelkonen, Jani. 2010. Geenitekniikka. Oppimateriaaleja 52. Turku: Turun ammattikorkeakoulu.
- 7 Brown, Tom & Brown, Tom Jr. 2014. Nucleic Acids Book. Nucleic acid structure. Verkkodokumentti. <<http://www.atdbio.com/content/5/Nucleic-acid-structure>>. Luettu 27.6.2014.
- 8 Brown, Tom & Brown, Tom Jr. 2014. Nucleic Acids Book. Solid-phase oligonucleotide synthesis. Verkkodokumentti. <<http://www.atdbio.com/content/17/Solid-phase-oligonucleotide-synthesis>>. Luettu 22.3.2014.
- 9 McMurry, John. 2008. Organic chemistry. 7. painos. Belmont: Thomson Brooks/Cole.
- 10 Oligomer Oy. Miten oligot puhdistetaan ja minkä puhdistustavan valitsen? 2014. Verkkodokumentti. <<http://www.oligomer.fi/fi/tietopankki/5/how-are-the-oligos-purified-and-which-method-of-purification-should-i-choose>>. Luettu 22.3.2014.
- 11 Glen-Pak™ Cartridges. DNA and RNA Purification. Glen Research. Verkkodokumentti. <http://www.glenresearch.com/Technical/GlenPak_UserGuide.pdf>. Luettu 22.3.2014.
- 12 Evaluating and Isolating Synthetic Oligonucleotides. User Bulletin 13, 1987. Applied Biosystems. A Division of Perkin-Elmer Corporation.

- 13 Brown, Tom & Brown, Tom Jr. 2014. Nucleic Acids Book. Purification of oligonucleotides. Verkkodokumentti. <<http://www.atdbio.com/content/7/Purification-of-oligonucleotides>>. Luettu 22.3.2014.
- 14 Ketola, Raimo, Kostiainen, Risto, Kotiaho, Tapio & Vainiotalo, Pirjo. 2010. Massaspektrometrian perusteet. Klaukkala: Suomen Massaspektrometrian Seura.
- 15 Jaarinen, Soili & Niiranen, Jukka. 2005. Laboratorion analyysitekniikka. 5. painos. Helsinki: Edita.
- 16 Hillenkamp, Franz & Peter-Katalinic, Jasna. 2007. MALDI MS. A Practical Guide to Instrumentation, Method and Applications. Weinheim: Wiley-VCH.
- 17 Kaltashov, Igor A. & Eyles, Stephen J. 2005. Mass Spectrometry in Biophysics. Conformation and Dynamics of Biomolecules. Hoboken: Wiley Interscience.
- 18 MALDI-TOF mass spectrometry. An introduction. Version 100623. 2010. Bruker Daltonics. Koulutusmateriaali.
- 19 Mass analyzers. 2014. Chromedia. Chromatography knowledge base. Verkkodokumentti. <<http://www.chromedia.org/chromedia?waxtrapp=kwbgcDsHqnOxmOIIEcCpBgFIFyB&subNav=oibeldsHqnOxmOIIEcCvBG>>. Luettu 29.5.2014.
- 20 Riekkola, Marja-Liisa & Hyötyläinen, Tuulia. 2000. Kolonnikromatografia ja kapillarielektromigraatiotekniikat. Helsinki: Helsingin yliopisto.
- 21 Analytical Methods. Mass spectrometry. 2014. Aldbio. Verkkodokumentti. <<http://www.atdbio.com/content/8/Analytical-methods#Matrix-Assisted-Laser-Desorption-Ionisation-Time-Of-Flight-Mass-Spectrometry-MALDI-TOF-MS>>. Luettu 29.5.2014.
- 22 Gilar, M., Belenky, A. & Wang, B. 2001. High-throughput biopolymer desalting by solid-phase extraction prior to mass spectrometric analysis. Journal of Chromatography A. Volume 921, s. 3 - 13.

LIITTEET (vain työn tilaajan käyttöön)